

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl.⁶

A61K 35/78

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98106650.X

[43]公开日 1999 年 10 月 27 日

[11]公开号 CN 1232675A

[22]申请日 98.4.17 [21]申请号 98106650.X
[71]申请人 中国人民解放军军事医学科学院毒物药
物研究所
地址 100850 北京市太平路 27 号
[72]发明人 赵毅民 张汉庭 杨 明
罗质璞 栾新慧

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 无毒棉花籽提取物,其提取方法,含它们的
药物组合物及其作为神经系统药物的用途

[57]摘要

本发明涉及无毒棉花籽提取物,其制备方法,含有它的
药组合物及其医药用途。

ISSN 1008-4274

专利文献出版社出版

说明书

无毒棉花籽提取物，其提取方法，含它们的

药物组合物及其作为神经系统药物的用途

本发明涉及无毒棉花籽提取物，其提取方法，含有它们的药物组合物及其作为神经系统药物的用途。

无毒棉花是锦葵科 (Malvaceve) 植物通过基因工程改造得到的一种新型植物，无毒棉花籽是无毒棉花的成熟果实的种子，其可以作为牲畜的饲料。但到目前为止，有关无毒棉花籽的活性成份及其生物活性未见有报道。

本发明的目的在于寻找并开发无毒棉花籽的新用途。

本发明人经研究现已发现通过下面方法得到的无毒棉花籽提取物显示出优良的神经系统生物活性，尤其是抗焦虑、抗抑郁作用，本发明基于以上发现得以完成。

根据本发明，本发明的提取物是如下得到的：将无毒棉花籽用有机溶剂，含水有机溶剂或水提取。所用的有机溶剂选自醇类如甲醇、乙醇、丙醇或丁醇等；卤代烷类如二氯甲烷，氯仿等；醚类如石油醚或乙醚等，酯类如乙酸甲酯、乙酸乙酯或乙酸丙酯等。

根据本发明，本发明的无毒棉花籽提取物具有下面的定性反应：

a) 将 1 % 吲哚醌丙酮溶液与 10ml 醋酸配成显示剂。将棉花籽提取物点在滤纸上，往该滤纸上喷洒上述显示剂，用吹风机吹干，待酸味不太浓时，将滤纸放入 100 °C 烘箱中烘 5 - 10 分钟，则滤纸上显出红、黄等颜色。

b) 显示剂的配制：A 液，将 0.5 克三氯化铁溶解于 50ml 水中得到；B 液，将 0.5 克铁氰化钾溶解于 50ml 水中得到，临用时，将 A、B 两液等体积混合。将棉花籽提取物样品点在纸上，喷洒上述溶液，立即呈明显蓝色斑点。

c)将干燥的棉花籽提取物样品溶解或悬浮于 0.5ml 醋酐中，滴加 1 滴浓硫酸，溶液呈紫红色，并且溶液的上层逐渐变为绿色。

d)将棉花籽的提取物点在滤纸片上，喷洒 0.05 % 荧光素水溶液，将纸片暴露在溴蒸气中（或碘蒸气中）斑点显黄色、背景很快就变为淡红色。

e)将棉花籽提取物溶解，放置到 10ml 试管内，加入 10 % 的 α - 萘酚乙醇液。摇匀，再沿着试管滴加少量浓硫酸，试管中液体与浓硫酸接触的界面有紫色的花环产生。

根据本发明，本发明第一方面涉及无毒棉花籽提取物，该提取物对人类神经系统显示出良好的生物活性，尤其是抗焦虑和抗抑郁活性。

根据本发明，本发明还涉及制备无毒棉花籽提取物的方法，其包括将无毒棉花籽用有机溶剂，含水有机溶剂或水提取。

根据本发明，本发明还涉及药物组合物，其包括作为活性成份的本发明无毒棉花籽提取物及一种或多种药用载体或赋形剂。

根据本发明，本发明还涉及无毒棉花籽提取物用于制备治疗神经系统疾病如焦虑、抑郁的药物的用途。

根据本发明，本发明无毒棉花籽提取物可单独或以药物组合物形式使用，其给药方式可根据具体情况而定，但优选口服。给予本发明无毒棉花籽的剂量一般为 1 - 300mg/kg 体重/日，优选 5 - 150mg/kg 体重/日。

下面通过实施例及生物实验进一步说明本发明，但这并不意味着对本发明的任何限制。

实施例 1

无毒棉花籽石油醚提取物的制备

将无毒棉花籽 5kg 粉碎过 100 目筛，然后用石油醚提取，每次用 10 升，提取三次，合并提取液，减压蒸发至干，得 320g 石油醚提取物，其具有前述的定性反应特征。

实施例 2

无毒棉花籽乙醇的取物的制备

将实施例 1 中药渣用乙醇提取，每次用 15 升，提取三次，合并提取

液，蒸发至干，得 510g 乙醇提取物，其也具有前述的定性反应特征。

实施例 3

无毒棉花籽正丁醇和水提取物的制备

将实施例 2 中乙醇提取物溶于水，过滤，滤液于正丁醇和水之间分配提取，得 20g 正丁醇提取物和 490g 水提取物，它们皆具有前述的定性反应特征。

本发明提取物的生物活性

抗焦虑作用实验：

1. 大鼠安全信号撤除 (safety signal withdrawal) 实验

(1) 方法 (参见文献 Thiebot MH. 等人, 精神药理 (Psychopharmacology), 1991, 103:415-24) : 实验用 MED 大鼠操作箱系统 (美国 Med 公司) 进行。

雄性 Wistar 大鼠, 初始体重 100 - 130g, 实验结束时体重 170 ~ 220g。动物随机分组。分训练和实验二个阶段。训练时让大鼠学会按固定比率 (FR)₁ 强化 (FR₁, 即每压杆一次获得一粒食丸), 接着过度到 FR₂、FR₄ 和 FR₈, 每天 18 分钟, 分为 5 个连续的时间段: 1, 4 分钟; 2, 4 分钟; 3, 3 分钟; 4, 4 分钟; 5, 3 分钟。其中, 1、3、5 为非惩罚期, 右灯亮 (安全信号), 按 FR₈ 强化, 2, 4 为惩罚期, 左灯亮 (惩罚信号), 按 FR₁ 强化的同时, 给予随机比率 50 % 的足电击。训练稳定 10 天进行实验。实验程序保留上述前 3 个时间段 (共 11 分钟但在 2 期 (即惩罚期) 右灯 (安全信号) 关闭, 不给电击仍按 FR₁ 强化, 记录安全期 (FR₈, 7 分钟) 和安全信号撤除期 (FR₁, 4 分钟) 大鼠获得食丸强化的次数。结果用 ANOVA 统计分析, 组间比较 Dunett'st 检验。抗焦虑药在不影响 FR₈ 强化的剂量增加 FR₁ 强化。结果见表 1。

表 1. 在大鼠安全信号撤除实验中实施例 3 的棉籽水提物的抗焦虑作用

药物 (mg/kg) n			强化数	
			安全期 (FR ₈)	安全信号撤除期 (FR ₁)
生理盐水 (对照)	n		47 ± 12	20 ± 10
地西洋	1.0	38	46 ± 8	33 ± 9*

丁螺环酮	1.0	16	47 ± 14	45 ± 8**
实施例 3 的水提物	100.0	7	52 ± 10	24 ± 13
	200.0	14	45 ± 13	31 ± 10*
	400.0	17	46 ± 12	29 ± 12*

$X \pm SD$, 与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(2) 讨论:

从表 1 可以看出, 抗焦虑药地西洋和丁螺环酮在 1mg/kg 均可显著增加安全信号撤除期的强化数, 而对安全期无影响。实施例 3 棉籽水提取物 100 ~ 400mg/kg 也有类似作用, 并呈一定的剂量关系, 表现出抗焦虑作用。

2. 大鼠 Vogel (冲突实验)

(1) 方法: 实验用美国 Lafayette 公司生产的 Model-102 型焦虑仪, 参考文献: 张汉霆等, 中国药理学与毒理学杂志, 1995; 9 (4): 254 - 7。雄性 Wistar 大鼠, 初重 180 ~ 220g, 禁水 48 小时后体重为 155 ~ 200g。大鼠随机分组, 禁水 24 小时后训练其舔水, 不加电击, 3 分钟内舔水不少于 300 次的继续禁水 48 小时后进行实验, 同时足底给予 0.3mA 的电击 (每舔水 20 次给 1 次电击)。仪器自动记录 3 分钟内舔水次数。抗焦虑药使这指标增高。统计分析同前。结果见表 2。

表 2. 在大鼠 Vogel 冲突模型上实施例 3 水提物的抗焦虑作用

药物 (mg/kg)	n	舔水次数
生理盐水 (对照)	9	216 ± 151
地西洋 3.0	8	467 ± 142*
实施例 3 水提物 100.0	7	356 ± 120
200.0	9	379 ± 116
400.0	8	431 ± 140*

$X \pm SD$. 与对照组比, * $P < 0.05$ 。

(2) 讨论

从表 2 可见, 地西洋 3mg/kg 可明显增高大鼠冲突期舔水次数, 实施例 3 水提物 100 ~ 400mg/kg 也可剂量依赖性地增加冲突期舔

水次数，呈抗焦虑作用。

说明书摘要

本发明涉及无毒棉籽提取物，其制备方法，含有它的药组合物及其医药用途。

权 利 要 求 书

1. 无毒棉籽提取物，其中无毒棉籽来自无毒棉花成熟果实的种子。
2. 制备无毒棉籽提取物的方法，其包括用有机溶剂，含水有机溶剂或水提取无毒棉籽。
3. 权利要求 2 的方法，其中有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、二氯甲烷、氯仿、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、石油醚或乙醚。
4. 药物组合物，其包括作为活性成份的权利要求 1 的无毒棉籽提取物和一种或多种药用载体或赋形剂。
5. 用于治疗神经系统疾病，尤其是焦虑和/或抑郁的药物组合物，其包括作为活性成份的权利要求 1 的无毒棉籽提取物和一种或多种药用载体或赋形剂。
6. 权利要求 1 的无毒棉籽提取物用于制备治疗神经系统疾病的药物。
7. 权利要求 1 的无毒棉籽提取物用于制备治疗焦虑和/或抑郁的药物。